

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-315597

(43)Date of publication of application : 29.10.2002

(51)Int.Cl.

C12P 41/00
//(C12P 41/00
C12R 1:01)
(C12P 41/00
C12R 1:38)

(21)Application number : 2001-125635

(71)Applicant : MITSUBISHI GAS CHEM CO INC

(22)Date of filing : 24.04.2001

(72)Inventor : DOTANI MASAHIRO
KONDO TOSHIO

(54) METHOD FOR MANUFACTURING OPTICALLY ACTIVE ALPHA-AMINO ACID

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an industrial method for manufacturing an optically active D- or L- α -amino acid by using D,L- α -amino acid amide.

SOLUTION: D,L- α -amino acid amide is hydrolyzed through a biochemical asymmetric hydrolysis using microbial cell bodies such as Mycoplana bullata, Mycoplana dimorpha, Rhodococcus erythropolis or Pseudomonas rosea or the like immobilized with a resin produced from a monomer of an acrylic acid ester, a methacrylic acid ester or a urethane acrylate.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-315597

(P2002-315597A)

(43)公開日 平成14年10月29日(2002.10.29)

(51)Int.Cl.
C 12 P 41/00
// C 12 P 41/00
C 12 R 1:01
(C 12 P 41/00
C 12 R 1:38)

識別記号

F I
C 12 P 41/00
C 12 R 1:01
1:38

九-7コ-1*(参考)
A 4 B 0 6 4

審査請求 未請求 請求項の数1 OL (全9頁)

(21)出願番号 特願2001-125635(P2001-125635)

(22)出願日 平成13年4月24日(2001.4.24)

(71)出願人 000004466
三菱瓦斯化学株式会社
東京都千代田区丸の内2丁目5番2号
(72)発明者 銀谷 正貞
新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱
瓦斯化学株式会社新潟研究所内
(72)発明者 近藤 俊夫
新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱
瓦斯化学株式会社新潟研究所内
Fターム(参考) A8064 A803 A805 A808 C402 C435
C438 C806 C001 C012 C027

(54)【発明の名称】 光学活性 α -アミノ酸類の製造方法

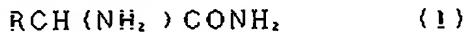
(57)【要約】 (修正有)

【課題】 D、L- α -アミノ酸アミドを用いて光学活性D-またはL- α -アミノ酸の工業的に製造する方法を提供する。

【解決手段】 アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類またはウレタンアクリレート類をモノマーとした樹脂により固定化した、ミコプラナ・ブラタ、ミコプラナ・シモルファ、ロドコッカス・エリスロボリス、シヌードモナス・ロゼア等の菌体を用いて、D、L- α -アミノ酸アミド類を生化学的不斉加水分解する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類またはウレタンアクリレート類をモノマーとした樹脂により固定化した菌体を用いて、一般式(1)で表されるD、L- α -アミノ酸アミド類を生化学的に不斉加水分解し、一般式(2)で表される光学活性 α -アミノ酸類を製造することを特徴とする光学活性 α -アミノ酸類の製造方法。



(Rは低級アルキル基、置換低級アルキル基、シクロヘキシル基、置換シクロヘキシル基、フェニル基、置換フェニル基、ベンジル基、置換ベンジル基、複素環基および置換複素環基である。)

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は光学活性 α -アミノ酸類の製造方法に関する。更に詳しくは固定化菌体を用いてD、L- α -アミノ酸アミド類を生化学的に不斉加水分解して対応するL-またはD- α -アミノ酸類を製造する方法に関する。光学活性 α -アミノ酸類は、各種工業薬品などの中間体ならびに、農薬、化粧品、飼料添加物、食品添加物および医薬品として重要な物質である。

【0002】

【従来の技術】 α -アミノ酸アミドを生化学的に加水分解して、光学活性 α -アミノ酸を製造する方法は公知である。例えば、D、L- α -アミノ酸アミドにシグザックロミセス層、ロドスボリジウム層、キャンディダ層、クリプトコッカス層、ビチロスピラム層、ロドトルラ層、トルロブシス層、トリコスボロン層またはトレメタ層に廻しL- α -アミノ酸アミド加水分解活性を有する微生物の培養液、生菌体あるいは菌体処理物を作用させ、対応するL- α -アミノ酸を製造する方法(特開昭59-159789)、D、L- α -アミノ酸アミドにロドスピラム層、ロドショードモナス層、スピリラム層、ミクロシクラス層、ショードモナス層、グルコノバクター層、アグロバクテリウム層、アルカリゲネス層、アクロモバクター層、アセトバクター層、エッシエリヒア層、エントロバクター層、セラチア層、アエロモナス層、フラボバクテリウム層、バラコッカス層、チオバチラス層、ストレプトコッカス層、コリネバクテリウム層、アルスロバクター層、ミクロバクテリウム層、ノカルシア層、ムコール層、リゾプス層、アスペルギラス層、ベニシリウム層、フサリウム層、ナドソニア層、ハンセニアスピラ層、ウイケルハミア層、サッカロマイセス層、ロッデロマイセス層、ピチャ層、ハンセメラ層、バチソレン層、シテロマイセス層、デバリオマイセス層、デッケラ層、サッカロマイコブシス層、リポマイセス層、ロイコスピリジウム層、スプロボロマイセス層、

10

20

30

40

50

スボリシオボラス層、オオスボリジウム層、ステリグマトマイセス層、またはトリコノブシス層に廻し、L- α -アミノ酸アミド加水分解活性を有する微生物の培養液、生菌体あるいは菌体処理物を作用させ、対応するL- α -アミノ酸を製造する方法(特開昭60-36446)、D、L- α -アミノ酸アミドにミコプラナ層またはプロタミノバクター層に廻し、L- α -アミノ酸アミド加水分解活性を有する微生物の菌体あるいは菌体処理物を作用させ、対応するL- α -アミノ酸を製造する方法(特開平01-277499)、D、L- α -アミノ酸アミドにミコバクテリウム、メタノリカ層に廻しL- α -アミノ酸アミド加水分解活性を有する微生物の菌体あるいは菌体処理物を作用させ、対応するL- α -アミノ酸を製造する方法(特開平01-215297)、D- α -アミノ酸アミドにアクロモバクター層、アルカリゲネス層またはクルチア層に廻しD- α -アミノ酸アミド加水分解活性を有する微生物の培養液、生菌体あるいは菌体処理物を作用させ、対応するD- α -アミノ酸を製造する方法(特開昭60-184392)、D- α -アミノ酸アミドにシュードモナス層、ロドコッカス層またはセラチア層に廻しD- α -アミノ酸アミド加水分解活性を有する微生物の培養液、生菌体あるいは菌体処理物を作用させ、対応するD- α -アミノ酸を製造する方法(特開昭61-274690)、D、L- α -アミノ酸アミドにロドコッカス層に廻しD- α -アミノ酸アミドを選択的に加水分解活性を有する微生物の培養液、生菌体あるいは菌体処理物を作用させ、対応するD- α -アミノ酸を製造する方法(特開昭63-087998)などが知られている。これら、従来の方法は、いずれも α -アミノ酸アミド含有水溶液へ微生物の培養液、生菌体あるいは菌体処理物を添加することによって行われる。

【0003】

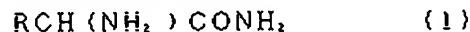
【発明が解決しようとする課題】従来、 α -アミノ酸アミド含有水溶液へ菌体あるいは菌体処理物を添加して反応させる場合、菌体が高価であることから、反応生成液から菌体あるいは菌体処理物を回収して、次の反応で再使用する必要がある。しかしながら、菌体あるいは凍結乾燥菌体のような菌体処理物を懸濁系で使用した場合には菌体膜の損傷による酵素の溶出により回収菌体の酵素活性は著しく低下したり、個々の細胞が微小であるため回収困難といった問題があった。これらを解決するために、固定化菌体の使用が考えられるが、これまでに、D、L- α -アミノ酸アミドの生化学的不斉加水分解反応で使用されている具体的な報告は認められない。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、固定化菌体を用いてD、L- α -アミノ酸アミド類を生化学的に不斉加水分解して光学活性 α -アミノ酸類を製造する方法について鋭意検討を行った結果、固定化するための樹

脂のモノマー（以下、固定化担体モノマーと称す）として、アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類又はウレタンアクリレート類を用いることにより担体の崩壊および膨潤なく長時間安定した酵素活性が得られることを見出し、本発明に到達した。

【0005】即ち、本発明はアクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類またはウレタンアクリレート類をモノマーとした樹脂により固定化した菌体を用いて、一般式(1)で表されるD、L- α -アミノ酸アミド類を生化学的不斉加水分解し、一般式(2)で表される光学活性 α -アミノ酸類を製造する光学活性 α -アミノ酸類の製造方法に関する。



(Rは低級アルキル基、置換低級アルキル基、シクロヘキシル基、置換シクロヘキシル基、フェニル基、置換フェニル基、ベンジル基、置換ベンジル基、複素環基および置換複素環基である。)

【0006】

【発明の実施の形態】本発明の方法は通常、固定化担体モノマー、架橋剤、重合促進剤および菌体を含有した液へ重合開始剤を添加し、重合させることにより固定化菌体を得、これを成形後、培地に充填し、D、L- α -アミノ酸アミド含有水溶液と固定化菌体とを接触させることにより行われる。

【0007】本発明で示される固定化担体モノマーの中のアクリル酸エステル類としては、例えばノニルフェノキシポリエチレングリコールアクリレート、ノニルフェノキシポリブロビレングリコールアクリレート、シリコン変性アクリレート、ポリブロビレングリコールモノアクリレート、フェノキシエチルアクリレート、フェノキシジエチレングリコールアクリレート、フェノキシポリエチレングリコールアクリレート、メトキシポリエチレングリコールアクリレート、アクリロイルオキシエチルハイドロジェンサクシネート、メトキシ化ネオベンチルグリコールシアクリレート、プロポキシ化ネオベンチルグリコールシアクリレート、ポリエチレングリコールシアクリレート、1,6-ヘキサンジオールシアクリレート、ネオベンチルグリコールシアクリレート、トリプロビレングリコールシアクリレート、ポリブロビレングリコールシアクリレート、2,2-ビス(4-アクリロキシジエトキシフェニル)ブロバン、2-ヒドロキシ-1-アクリロキシ-3-メタクリロキシブロバン、エトキシ化トリメチロールブロバントリアクリレート、エトキシ化ペントエリスリトールテトラアクリレート、プロポキシ化ペントエリスリトールテトラアクリレート、ジトリメチロールブロバンテトラアクリレート等。

【0008】メタクリル酸エステル類としては、例えば

1、3-ブチレングリコールジメタクリレート、1,4-ブタンジオールジメタクリレート、エチレングリコールジメタクリレート、ジエチレングリコールジメタクリレート、トリエチレングリコールジメタクリレート、ポリブロビレングリコールモノメタクリレート、ポリエチレングリコールジメタクリレート、ブチレングリコールジメタクリレート、ヘキサンジオールジメタクリレート、ネオベンチルグリコールジメタクリレート、ポリブレングリコールモノメタクリレート、ポリブレングリコールジメタクリレート、2-ヒドロキシ-1,3-ジメタクリロキシプロパン、2,2-ビス(4-メタクリロキシエトキシフェニル)ブロバン、2,2-ビス(4-メタクリロキシジエトキシフェニル)ブロバン、2,2-ビス(4-メタクリロキシポリエトキシフェニル)ブロバン、トリメチロールブロバントリメタクリレート、メトキシジエチレングリコールメタクリレート、メトキシポリエチレングリコールメタクリレート、メタクリロイルオキシエチルハイドロジェンサクシネート、メタクリロイルオキシエチルハイドロジェンサクシネート、3-クロロ-2-ヒドロキシプロビルメタクリレート、ステアリルメタクリレート、2-ヒドロキシメタクリレート、エチルメタクリレート等、ウレタンアクリレート類としてはウレタンアクリレート、ウレタンジメチルアクリレート、ウレタントリメチルアクリレートが挙げられる。

【0009】架橋剤としては、例えば、N、N'-メチレンビスアクリルアミド、N、N'-ブロビレンビスアクリルアミド、ジアクリルアミドジメチルエステル等である。また、重合促進剤としては、例えば、 β -ジメチルアミノブロビオニトリル、N、N、N'、N'-テトラメチルエチレンジアミン等である。重合開始剤としては、通常過硫酸カリウムが使用される。

【0010】本発明の固定化菌体製造に使用される微生物は、D、L- α -アミノ酸アミド類を不斉加水分解し、対応する光学活性 α -アミノ酸を生成する活性を有するものであれば、特に限定されるものではない。微生物の培養は、使用微生物が通常資化し得る炭素源、窒素源、各微生物に必須の無機塩、栄養等を含有させた培地を用いて行われるが、高い酵素活性を得るために培地へ予めD、L- α -アミノ酸アミドを添加することも効果的である。この際に使用されるD、L- α -アミノ酸アミドは、目的とする光学活性 α -アミノ酸に対するD、L- α -アミノ酸アミドであることが好ましいが、他の α -アミノ酸アミドでも良い。培養時のpHは4~10の範囲であり、温度は20~50°Cである。培養は1日~1週間好気的に行われる。このようにして培養した微生物は培養液、濃縮菌体あるいは湿菌体として固定化菌体の製造に使用される。固定化菌体以下のように製造される。固定化担体モノマー濃度1.0~2.5wt%、架橋剤濃度0.3~3wt%、重合促進剤濃度0.1~2wt%、菌体濃度(乾燥菌体として)1~15wt%

%、重合開始剤濃度0.1～1wt%とした溶液を温度10～50℃の範囲に保つことにより重合をおこなわせる。このようにして製造した固定化菌体は適當な大きさに成型後、塔に充填し、D、L- α -アミノ酸アミドの生化学的不斉加水分解反応に使用される。

【0011】本発明の一式(1)で示される α -アミノ酸アミド類のRの低級アルキル基には特に制限はないが、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチルおよびtert-ブチルなどのC₁～C₄の直鎖または分岐した低級アルキル基であり、複素環基としては、フリル基、ビリジル基、チアゾリル基、イミダゾリル基およびインドリル基であり、また、置換低級アルキル基、置換シクロヘキシリル基、置換フェニル基、置換ベンジル基および置換複素環基のそれぞれに含まれる置換基は、例えばヒドロキシ、メトキシ、メルカブト、メチルメルカブト、アセタール、カルボキシル、カルボクサミド、ハロゲン、イミダゾリルおよびインドリルなどである。一式(1)で表される α -アミノ酸アミド類の代表例としては、グリシンアミド、アラニンアミド、2-アミノ酪酸アミド、バリンアミド、ロイシンアミド、イソロイシンアミド、t-ロイシンアミド、セリンアミド、スレオニンアミド、システインアミド、シスチンアミド、メチオニンアミド、アスパラギンアミド、グルタミンアミド、フェニルグリシンアミド、フェニルアラニンアミド、チロシンアミド、トリプトファンアミドおよびヒスチジンアミドなどが挙げられる。

【0012】また、本発明の一式(2)で示される光*

培地組成：グルコース
ポリペプトン
酵母エキス
 KH_2PO_4
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$
蒸留水
pH

7 g
3.5 g
3.5 g
1.4 g
0.28 g
0.01 g
0.01 g
700 mL
7

培養終了時、培養液の菌体濃度は0.52wt%であった。この培養液250mLから遠心分離により5.4gの生菌体を得た。

【0014】(2) 固定化菌体の調製

ポリエチレングリコール1000-ジメタクリレート5.4g、N,N'-メチレンビスアクリルアミド0.30gを100mLビーカーに秤取し、水10mLを加え溶解後、 β -ジメチルアミノプロピオニトリル0.15gを添加、次いで(1)で得た生菌体全量を加え良く混和した。この菌懸滴スラリーへ、2.5wt%過硫酸カリウム3gを添加し、素早く混合後1時間放置し、次いで3～4mm角に裁断し固定化菌体成型品を得た。

*光学活性 α -アミノ酸類は、上記 α -アミノ酸アミド類に対応した光学活性 α -アミノ酸類である。使用原料である α -アミノ酸アミド類含有水溶液中の α -アミノ酸アミド濃度は、特に限定されるものではないが、通常は10～50重量%である。固定化菌体充填塔を用いたD,L- α -アミノ酸アミドの生化学的不斉加水分解反応は、通常、固定化菌体を充填した多段塔へD,L- α -アミノ酸アミド水溶液を連続的に供給することにより行われる。D,L- α -アミノ酸アミドの供給速度は、菌の保有する酵素活性の強さ、固定化菌体中の菌体濃度等により一概に言えないが、1～10g/dry cell/L/hであり、反応温度は20～70℃、反応pH 5～13の範囲である。D,L- α -アミノ酸アミドの生化学的不斉加水分解反応で生成したL-またはD- α -アミノ酸は、反応生成液からイオン交換膜透析による分離後、濃縮晶出、あるいは減圧濃縮後アルコール類を加えてL-またはD- α -アミノ酸を析出させ遮取するなどの方法により容易に分離することができる。

【0013】

【実施例】以下に実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこの実施例により限定されるものではない。

実施例1

(1) 使用菌の培養

次の組成の培地を調製し、この培地250mLを1L三角フラスコに入れ、滅菌後、ミコプラナ ブラタ(*Mycoplana bullata*) NCIB9440を接種し、30℃で48時間振とう培養を行った。

培地組成：	グルコース	7 g
	ポリペプトン	3.5 g
	酵母エキス	3.5 g
	KH_2PO_4	1.4 g
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.28 g
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01 g
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.01 g
	蒸留水	700 mL
	pH	7

【0015】(3) 酵素反応

第一反応塔と第二反応塔とを直列に連結した装置(図40)1)を用いて連続加水分解反応を行った。その際原料溶液を第一反応塔に供給し、生成物溶液を第二反応塔より抜き出す。また第一反応塔では反応液を塔内で循環し、第二反応塔では塔内で循環しない。第一反応塔および第二反応塔のそれぞれに(2)で得られた固定化菌体成型品を1/2層づつ充填した。原料溶液は20wt%D,L-ロイシンアミド水溶液($MnCl_2$ 1000μM/L添加)であり、原料溶液の第一反応塔への供給速度は6g/hで行った。第一反応塔内での反応液循環量は600g/hとした。第一反応塔内および第二反応塔内での反応温度は何れも30℃とした。第一反応塔内お

より第二反応塔内の滞留時間は何れも4時間とした。
結果を表1に示す。表1からわかるように、3000時
間経過しても酵素活性の低下は殆ど認められなかった。*

* なお、原料アミドの加水分解率は以下の式に基づき算出
した。

(生成光学活性アミノ酸のモル数) × 2

$$\text{加水分解率(%)} = \frac{(生成光学活性アミノ酸のモル数) \times 2}{(\text{原料D,L-アミノ酸アミドのモル数})} \times 100$$

[0016]

表1

経過時間 (hr)	D,L-ロイシンアミド加水分解率(%) 第一反応塔	D,L-ロイシンアミド加水分解率(%) 第二反応塔	L-ロイシン蓄積生産量 (g/g dry cell)
100	40	49	4.5
500	38	49	22.7
1000	39	49	44.8
1500	39	50	67.8
2000	39	49	90.7
2500	39	49	113.2
3000	39	49	135.1

[0017] 実施例2

(1) 使用菌の培養

使用菌としてミコプラナ ジモルファ (*Mycoplasma dimorpha*) IFO 13291を使用し、培地へD,L-t-ロイシンアミド3.5gを添加した以外は実施例1と同様にして培養を行った。培養終了時、培養液の菌体濃度は0.54wt%であった。この培養液250mlから遠心分離により5.3gの生菌体を得た。

[0018] (2) 固定化菌体の調製

メトキシポリエチレンゴリコール400-Aクリレート5.4g、ジアクリルアミドジメチルエスチル0.30gを100mlビーカーに秤取し、水10mlを加え溶解後、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン0.15gを添加、次いで(1)で得た生菌体全量を加え良く混合した。この菌懸濁スラリーへ2.

5wt%過硫酸カリウム3gを添加し、素早く混合後※

※ 1時間放冷し、次いで3~4mm角に裁断し固定化菌体成型品を得た。

[0019] (3) 酵素反応

実施例1と同様な装置を使用し、各塔に(2)で得られた固定化菌体成型品を1/2層づつ充填し、下記反応条件でD,L-t-ロイシンアミドの連続加水分解反応を行った。原料溶液は1.5wt%D,L-t-ロイシンアミド水溶液(MnCl₂ 1000μM/L添加)であり、原料溶液の第一反応塔への供給速度は2g/hrで行った。第一反応塔内での反応液循環量は600g/hrとした。第一反応塔内および第二反応塔内での反応温度は何れも45°Cとした。第一反応塔内および第二反応塔内での滞留時間は何れも12時間とした。実験結果を表2に示す。表2からわかるように、2000時間経過しても酵素活性の低下は殆ど認められなかった。

[0020]

表2

経過時間 (hr)	D,L-t-ロイシンアミド加水分解率(%) 第一反応塔	D,L-t-ロイシンアミド加水分解率(%) 第二反応塔	L-t-ロイシン蓄積 生産量(g/g dry cell)
100	35	46	1.4
500	35	47	7.0
1000	35	46	13.8
1500	35	46	20.8
2000	35	46	28.0

[0021] 実施例3

(1) 使用菌の培養

使用菌として、ロドコッカス エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) FERM p-8938を使用した以外は実施例1と同様にして培養を行った。培養終了時、培養液の菌体濃度は0.57wt%であった。この培養液250mlから遠心分離により5.6gの生菌体を得た。

[0022] (2) 固定化菌体の調製

ウレタンアクリレート5.4g、N,N,N',N'-メチレンビスアクリルアミド0.3gを100mlビーカーに秤取し、水10mlを加え溶解後、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン0.15gを添加、次いで(1)で得た生菌体全量を加え良く混合した。この菌懸濁スラリーへ2.5wt%過硫酸カリウムを添加し、素早く混合後1時間放冷し、次いで3~4mm角に

裁断し、固定化菌体成型品を得た。

【0023】(3) 酵素反応

実施例1と同様な装置を使用し、各塔に(2)で得られた固定化菌体成型品を1/2置づつ充填し、下記反応条件でDL-バリンアミドの連続加水分解反応を行った。原料溶液は20wt%D,L-バリンアミド水溶液(エチレンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸10⁻³M/し添加)であり、原料溶液の第一反応塔への供給速度*

*は8g/hrで行った。第一反応塔内での反応液循環量は600g/hrとした。第一反応塔内および第二反応塔内での反応温度は何れも40°Cとした。第一反応塔内および第二反応塔内での滞留時間は何れも3時間とした。結果を表3に示す。表3からわかるように、3000時間経過しても酵素活性の低下は殆ど認められなかつた。

【0024】

表3

経過時間 (hr)	D,L-バリンアミド加水分解率(%)		D-バリン蓄積生産量 (g/g dry cell)
	第一反応塔	第二反応塔	
100	39	49	79
500	39	49	396
1000	39	49	789
1500	39	49	1182
2000	39	49	1574
2500	38	49	1970
3000	39	49	2362

【0025】実施例4

(1) 使用菌の培養

グルコース1.0wt%、ポリベプトン1.0wt%および酵母エキス1.0wt%を含有する種培地を調製し、この種培地30mLを100mL三角フラスコに入※

※れ、滅菌後、種菌としてショードモナス ロゼア (Pseudomonas rosea) NCTC 10605を接種し、30°Cで48時間振とう培養を行い種培養液を得た。この種培養液を次の組成の本培地2Lに移植し、30°Cで48時間通気搅拌培養を行った。

本培地組成 :	グルコース	1.0g
	ポリベプトン	0.5g
	酵母エキス	0.5g
	KH ₂ PO ₄	0.1g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.04g
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.001g
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.001g
	DL-バリンアミド	0.5g
	pH	7

培養終了時、培養液の菌体濃度は0.51wt%であった。この培養液2Lから遠心分離により42.4gの生菌体を得た。

【0026】(2) 固定化菌体の調製

(1) 得た生菌体4gを使用した以外は実施例1と同様にして固定化菌体成型品を得た。

【0027】(3) 酵素反応

実施例1と同様な装置を使用し、各塔に(2)で得られた固定化菌体成型品を1/2置づつ充填し、下記反応条件でDL-バリンアミドの連続加水分解反応を行った。★

★原料溶液は20wt%D,L-バリンアミド水溶液(MnCl₂ 1000μM/L添加)であり、原料溶液の第一反応塔への供給速度は6g/hrで行った。第一反応塔内および第二反応塔内での反応温度は何れも40°Cとした。第一反応塔内および第二反応塔内での滞留時間は何れも4時間とした。結果を表4に示す。表4からわかるように、3000時間経過しても酵素活性の低下は殆ど認められなかった。

表4

経過時間 (hr)	D,L-バリンアミド加水分解率(%)		L-バリン蓄積生産量 (g/g dry cell)
	第一反応塔	第二反応塔	
100	43	50	62
500	41	50	310
1000	41	50	620
1500	41	50	935
2000	41	50	1247

11		
2500	41	50
3000	41	50

【0029】比較例1

(1) 固定化菌体の調製

アルギン酸ソーダー 0.75 g を 100 mL ピーカーに秤取し、水 23 mL を加え 40°C 加温溶解後、実施例 4 (1) で得られた生菌体 4.5 g を加え良く混合した。この菌懸濁液を注射器を用いて、5°C に冷却した 2% 塩化カルシウム溶液 250 mL 中へ滴下、そのまま 2 時間ゆっくり攪拌し、3~5 mm の粒状固定化菌体を得た。

【0030】(2) 酵素反応

実施例 4 と同様にして D,L-パリンアミドの連続加水分解反応を行った。結果を表 5 に示す。その結果、単体の膨潤が著しく、このために菌の漏出により酵素活性が低下、反応開始から 230 時間経過した時点で第一反応塔内固定化菌体がドロドロに崩壊した。

【0031】

表5

経過時間 (h r)	D,L-パリンアミド加水分解率 (%) 第一反応塔	D,L-パリンアミド加水分解率 (%) 第二反応塔
50	33	50
100	21	38
150	18	32
200	18	31
230	-	-*

* 第 1 塔固定化菌体がドロドロに崩壊

【0032】比較例2

(1) 固定化菌体の調製

実施例 4 (1) で得られた生菌体 4 g を 100 mL ピーカーに秤り、生理食塩水 10 mL を加え懸濁後、アクリルアミドモノマー 2.8 g、N、N' - メチレンビスアクリルアミド 0.15 g、5% β - ジメチルアミノプロピオニトリル 1.9 mL を加え、良く混合溶解した。この菌懸濁液スラリーへ 2.5% K, S, O, 1.5 mL を添加し、混合後 37°C で 30 分間放置し、室温まで冷却後 3~4 mm 角に裁断し固定化菌体成型品を得た。

【0033】(2) 酵素反応

実施例 4 と同様にして D,L-パリンアミドの連続加水分解反応を行った。実験結果を表 6 に示す。その結果、初期活性は比較例 1 のアルギン酸カルシウムを使用した場合より高かったが、経時的に単体の膨潤による酵素活性の低下が著しく、反応開始から 350 時間経過した時点で実験を中止した。

【0034】

12		
1560	1871	

表6

経過時間 (h r)	D,L-パリンアミド加水分解率 (%) 第一反応塔	D,L-パリンアミド加水分解率 (%) 第二反応塔
50	43	50
100	39	49
150	35	46
200	33	43
250	30	39
300	24	37
350	19	33

【0035】比較例3

(1) 固定化菌体の調製

κ - カラギーナン 0.85 g を 100 mL ピーカーに秤取し、水 23 mL を加え、40°C 加温溶解後、実施例 4 (1) で得られた生菌体 4 g を加え良く混合した。この菌懸濁液を 10°C で 30 分間冷却し固化後、0.3 mol/L KC 1 溶液に 1 時間浸した後 3~4 mm 角に成型した。別途調製した 0.3 mol/L KC 1、0.05 mol/L ヘキサメチレンジアミン、0.5 mol/L LKH₂PO₄ 溶液 (pH 7) 10 mL を 5°C に冷却し、この中へ上記成型した固定化菌体を浸漬し 10 分間ゆるく攪拌後、0.1 mol/L グルタルアルデヒド 4 mL を添加し 5°C で 30 分間攪拌し硬化処理を行った。硬化処理後、液を分離し、冷り、3 mol/L KC 1 溶液で 2 時間洗浄し固定化菌体を得た。

【0036】(2) 酵素反応

実施例 4 と同様にして D,L-パリンアミドの連続加水分解反応を行った。実験結果を表 7 に示す。その結果、ゲルの膨潤および酵素活性の低下は認められないが、固定化菌体調製時の活性低下が大きく、実施例 4 に示す本願発明に比較して著しく悪いことから反応開始から 350 時間経過した時点で実験を中止した。

【0037】

表7

経過時間 (h r)	D,L-パリンアミド加水分解率 (%) 第一反応塔	D,L-パリンアミド加水分解率 (%) 第二反応塔
50	21	34
100	23	36
150	21	35
200	22	36
250	21	34
300	21	35
350	21	34

【0038】比較例4

(1) 固定化菌体の調製

ポリエチレングリコール (4000) 1000 重量部、ポリプロピレングリコール (4000) 1000 重量部、イソホロンジシソシアナート 220 重量部および

13

メタアクリル酸2-ヒドロキシエチル130重量部から得られた光硬化性樹脂8gおよびアルギン酸ナトリウム0.12gを100mLビーカーへ秤取し、水18mLを加え溶解後、ベンゾインイソブチルエーテル0.2gおよび実施例4(1)で得られた生菌体4gを加え良く混和した。この菌懸濁液を、注射器を用いて0.5mL／しづ塩化カルシウム溶液を入れたシャーレ中へ滴下し、粒径2～3mmの粒状物を得た。次いで、波長365nmの紫外線を3分間照射し、固定化菌体を得た。

【0039】(2)酵素反応

実施例4と同様にしてD,L-パリンアミドの連続加水分解反応を行った。実験結果を表8に示す。その結果、固定化菌体調製時の活性低下が大きく、初期活性が実施例4に示す本願発明に比較して著しく低いことから反応開始から100時間経過で実験を中止した。

【0040】*

*

14

表8

経過時間 (hr)	D,L-パリンアミド加水分解率(%)	
	第一反応塔	第二反応塔
10	13	21
50	12	20
100	12	20

【0041】実施例5原料アミド濃度を10wt%とした以外は実施例4と同様にして、各種D,L-アミノ酸アミド(D,L-フェニルグリシンアミド、D,L-フェニルアラニンアミド、D,L-トリプトファンアミド)から対応するL-アミノ酸の連続加水分解反応を行った。その結果を表9～11に示す。その結果、いずれのアミドについても、2000時間経過で酵素活性の低下は殆ど認められなかった。

【0042】

*

表9

経過時間 (hr)	D,L-フェニルグリシンアミド加水分解率(%)	
	第一反応塔	第二反応塔
100	39	49
500	39	49
1000	39	49
1500	39	49
2000	38	49

【0043】

表10

経過時間 (hr)	D,L-フェニルアラニンアミド加水分解率(%)	
	第一反応塔	第二反応塔
100	36	49
500	36	48
1000	36	49
1500	36	48
2000	36	48

【0044】

表11

経過時間 (hr)	D,L-トリプトファンアミド加水分解率(%)	
	第一反応塔	第二反応塔
100	39	50
500	39	50
1000	36	50
1500	36	50
2000	36	50

【0045】

【発明の効果】本発明の方法によって、比較的安価なD,L-α-アミノ酸アミド類から、光学活性D-またはL-α-アミノ酸類を容易に且つ効率良く製造することが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1の連続加水分解反応で使用した反応装置の概略図を示す。

【符号の説明】

- 1 原料貯槽
- 2 天秤
- 3 供給ポンプ
- 4 循環ポンプ
- 5 第一反応塔
- 6 第二反応塔
- 7 反応液貯槽

【図1】

